

MARIANA PIRIH CORDEIRO

APOPTOSE: O SUICÍDIO DAS CÉLULAS

Monografia desenvolvida no
Departamento de Patologia Básica
do Setor de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Paraná
como requisito parcial para
obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof. Ida Cristina Gubert

AGRADECIMENTOS

À Ida, uma professora exemplar, não só por saber transmitir muito bem seu vasto conhecimento e experiência, mas acima de tudo por transmitir o entusiasmo e alegria necessários a realização de todo trabalho. Obrigada por tudo que aprendi e principalmente pelo incentivo, apoio e compreensão.

Ao meu primo Tinho pelo auxílio, dicas e amizade.

À minha família, especialmente minha mãe Vanda, por toda minha formação, por estar sempre presente, pelo incentivo, apoio, por sua constante preocupação e pelo carinho.

Ao Orleí pela ajuda, incentivo, paciência, amor e compreensão.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. DESENVOLVIMENTO.....	3
2.1 A Morte celular: apoptose X necrose.....	3
2.2 Importância da apoptose.....	6
2.3 Mecanismos e genes da apoptose.....	8
2.3.1 Fator Fas.....	11
2.3.2 As caspases.....	12
2.3.3 Ca^{++}	13
2.3.4 Controle Hormonal da apoptose.....	13
2.4 Apoptose na resposta imune.....	16
2.5 Apoptose na patogênese de doenças.....	18
2.5.1 Doenças associadas com aumento da sobrevivência celular....	19
2.5.1.1 Apoptose e câncer.....	19
2.5.1.2 Apoptose e autoimunidade.....	20
2.5.1.3 Apoptose e infecções virais.....	22
2.5.2 Doenças associadas com excesso de apoptose.....	24
2.5.2.1 Apoptose e AIDS.....	24
2.5.2.2 Apoptose e doenças neurodegenerativas.....	26
2.5.2.3 Apoptose e doenças hematológicas.....	27
2.5.2.4 Apoptose e o sistema cardiovascular.....	28
2.5.2.5 Outras doenças.....	28
2.6 Apoptose e senescência.....	29
2.7 Métodos de avaliação da apoptose.....	30
2.8 Perspectivas para o futuro.....	33
3. CONCLUSÃO.....	36
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

1- INTRODUÇÃO

A apoptose, morte celular programada, é uma forma fisiológica de morte celular que apresenta sofisticado controle genético e é caracterizada por mudanças bioquímicas e morfológicas distintas, como: ativação de proteases endógenas resultando em ruptura do citoesqueleto, condensação celular, perda das especializações de membrana, desenvolvimento de vesículas de membrana na superfície celular, condensação cromatínica, degradação oligonucleossômica do DNA por endonucleases, e, finalmente, fragmentação da célula em “corpos apoptóticos”, que são fagocitados por macrófagos, sem indução de resposta inflamatória. A apoptose é um mecanismo muito importante para a manutenção da homeostase nos organismos multicelulares, pois regula precisamente o número de células no organismo, além de contribuir para a defesa, eliminando células perigosas ou indesejadas, como linfócitos auto-reativos, células infectadas por vírus ou células tumorais. Além disso, está envolvida na remoção organizada de tecidos que ocorre durante o desenvolvimento embriológico e involução de órgãos. A desregulação da apoptose está relacionada a várias doenças humanas, como câncer, doenças autoimunes, doenças neurodegenerativas e infecções virais, inclusive a AIDS. A “maquinaria” básica para realizar a apoptose parece estar presente em todas as células de mamíferos, mas sua ativação é regulada por sinais intra e extracelulares. Pelo menos alguns componentes do programa apoptótico foram conservados na evolução animal regulando uma via final de morte celular preservada, desde vermes até humanos. Entre os sinais que regulam a apoptose estão: informação da linhagem, dano celular por radiação ou infecção viral, fatores extracelulares de sobrevivência, interações celulares e hormônios. Vários genes estão implicados no controle da apoptose, como por exemplo, a família bcl-2, o p53, c-myc, e outros. Além disso, existem moléculas que interagem com receptores de membrana, como o sistema Fas-FasL para a indução da apoptose. Com as recentes descobertas do papel da apoptose na patogênese de várias doenças, surgiram possibilidades de novas terapias, objetivando o controle dos eventos apoptóticos.

Em virtude das crescentes evidências a respeito da importância da apoptose, foi proposta a realização deste trabalho, no qual foi realizada uma revisão da bibliografia mais atual publicada sobre apoptose relacionando-a com o desenvolvimento do organismo e doenças como doenças autoimunes, câncer, AIDS e outras infecções, possibilitando a estudantes e interessados um acesso mais rápido e simplificado a informações importantes e atuais em torno desse assunto.

2- DESENVOLVIMENTO

2.1 - A Morte celular: apoptose X necrose

Um dos problemas mais difíceis enfrentado na evolução dos seres vivos foi a passagem dos organismos unicelulares aos complexos organismos multicelulares. Isto significou resolver problemas como: adesão celular, transdução de sinais do meio e diferenciação (HEGENBERGER & GHIRLANDA, 1997). A massa de células nestes organismos passou a ser determinada pela relação entre o número de células que se dividiam e que morriam. Assim, a homeostase dos organismos multicelulares é mantida através de um equilíbrio entre proliferação e morte celular (THOMPSON, 1995; SOLARY *et al*, 1996; HEGENBERGER & GHIRLANDA, 1997). Enquanto a mitose tem sido estudada há muito tempo como mecanismo de proliferação celular, a morte celular e os fatores que a determinam vêm despertando o interesse para compreensão de vários processos fisiológicos e patológicos (THOMPSON, 1995; HEGENBERGER & GHIRLANDA, 1997).

Duas são as maneiras através das quais as células podem morrer: pela ação de agentes nocivos (necrose) ou através do suicídio celular (apoptose). Tanto um mecanismo quanto o outro envolvem uma seqüência de eventos bioquímicos e morfológicos consecutivos que resultam na morte da célula (KIESS & GALLAHER, 1998).

As células que sofrem injúrias letais, como isquemia, trauma mecânico, exposição a agentes tóxicos ou calor, têm uma morte acidental resultante de danos que não podem ser reparados. Estas células morrem por um processo denominado necrose, caracterizado por uma série de mudanças tais como aumento de 20-30% do volume intracelular por falhas das bombas iônicas, ou seja, rápido inchaço da célula e de organelas como as mitocôndrias; degeneração das mitocôndrias e perda da integridade da membrana plasmática, com conseqüente liberação de substâncias intracelulares, e resposta inflamatória no tecido vizinho; interrupção da síntese protéica; desorganização do núcleo; clivagem desordenada do DNA; esfacelamento da carioteca. A célula se desintegra e é fagocitada no contexto da reação inflamatória gerada por sua

morte (THOMPSON, 1995; STELLER, 1995; ORRENIUS, 1995; CAFFORIO, 1996; HEGENBERGER & GHIRLANDA, 1997; KUBY, 1997; KIESS & GALLAHER, 1998).

A apoptose, suicídio ou morte pré-programada da célula, é uma forma fisiológica de morte celular que apresenta um sofisticado controle genético, envolve de maneira ativa as estruturas celulares e é caracterizada por mudanças bioquímicas e morfológicas distintas, tendo um papel central no desenvolvimento e diferenciação do indivíduo bem como nos processos patológicos (ORRENIUS, 1995; STELLER, 1995; THOMPSON, 1995; CAFFORIO, 1996; HEGENBERGER & GHIRLANDA, 1997; KIESS & GALLAHER, 1998). A apoptose é caracterizada pelas seguintes alterações na célula: ativação de proteases endógenas resultando em ruptura do citoesqueleto (THOMPSON, 1995; HEGENBERGER & GHIRLANDA, 1997), diminuição do volume celular/ condensação celular, perda das regiões de especializações de membrana como as microvilosidades, conservação morfológica da maioria das organelas citoplasmáticas, desenvolvimento de vesículas de membrana (blebs) na sua superfície, condensação cromatínica, degradação oligonucleossômica do DNA pela ação de endonucleases, ou seja, a célula tem sua cromatina fragmentada ordenadamente em oligossomos de várias dimensões mas correspondentes a múltiplos de 180-200 pares de bases. Finalmente, ocorre a fragmentação do núcleo e a célula, então, se reduz a pequenos fragmentos envolvidos por membrana, os "corpos apoptóticos" contendo cromatina fragmentada e organelas, que são fagocitados por macrófagos ou células vizinhas, não havendo indução de resposta inflamatória (Figuras 1 e 2). Assim, as células mortas são rapidamente removidas, e qualquer vazamento do seu conteúdo nocivo e possivelmente perigoso é evitado (WYLLIE, 1994; THOMPSON, 1995; STELLER, 1995; CAFFORIO, 1996; HEGENBERGER & GHIRLANDA, 1997; KUBY, 1997). A apoptose é também caracterizada pela perda da função mitocondrial (THOMPSON, 1995).

O intervalo de tempo entre o comprometimento da célula até o aparecimento dos primeiros sinais da apoptose na morfologia celular varia de acordo com o tipo celular e o estímulo que provocou a sua morte; mas, há um consenso de um período de uma a duas horas, talvez um pouco menor, desde o

aparecimento das primeiras mudanças estruturais até o desaparecimento desta célula (fagocitose) (WYLLIE, 1994).

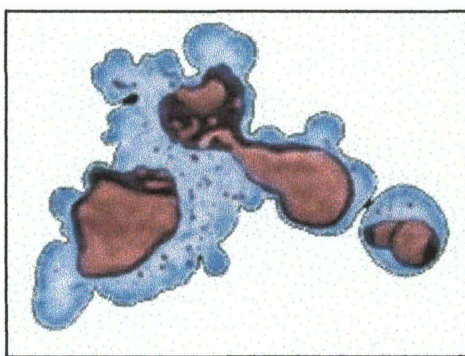


Figura 1 - Célula apoptótica
(© James A. Sullivan em
www.cellsalive.com).

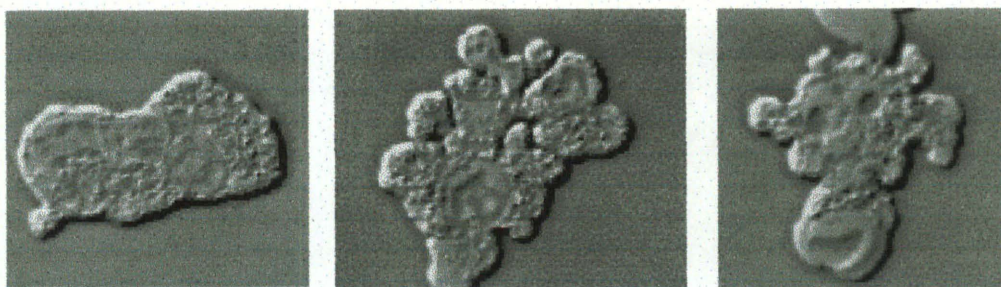


Figura 2 - Sequência apoptótica (© James A. Sullivan em
www.cellsalive.com).

2.2 - Importância da apoptose

A apoptose é um processo tão importante quanto a mitose para o desenvolvimento e manutenção da homeostase nos metazoários pois regula precisamente o número de células do organismo, possibilitando a constante renovação dos tecidos, e contribui significativamente para a deleção de elementos celulares indesejados ou funcionalmente perigosos em diversos processos, como linfócitos auto-reativos, células infectadas por vírus e células tumorais. Ela está envolvida também na remoção organizada de tecidos, sem cicatrizes ou perda da arquitetura, tal como o remodelamento tecidual que ocorre durante o desenvolvimento embriológico e involução de órgãos (MALE *et al*, 1991; STELLER, 1995; CAFFORIO, 1996; KIESS & GALLAHER, 1998). Por exemplo, a apoptose é responsável pela remoção do tecido interdigital durante a formação dos dedos do feto; pela atrofia progressiva dos órgãos larvais, como a cauda, durante a metamorfose nos anfíbios; pela involução normal de tecidos que dependem da concentração de hormônios no sangue, dentre outros exemplos. (KIESS & GALLAHER, 1998)

O papel da apoptose no controle geral das funções vitais da célula é extremamente importante. Assim, a desregulação da apoptose e o insucesso de algumas células em sofrer morte celular programada estão relacionadas a várias doenças humanas como câncer, doenças autoimunes e infecções virais (STELLER, 1995; THOMPSON, 1995; CAFFORIO, 1996), enquanto outras patologias estão relacionadas com um aumento da taxa de apoptose, como doenças neurodegenerativas, AIDS e osteoporose (THOMPSON, 1995; MAY, 1998).

O equilíbrio numérico da população de neutrófilos é um exemplo claro da importância da apoptose. No homem adulto, há aproximadamente 5×10^{10} neutrófilos circulantes, com uma vida média de um dia. A morte, associada com a produção constante de neutrófilos mantém níveis equilibrados destas células. Caso haja uma falha no processo de apoptose ocorre uma leucemia (KUBY, 1997).

A morte celular programada raramente ocorre em procariontes ou protozoários, organismos que proliferam perpetuamente sob condições ideais no meio. Todavia, já foi descrita apoptose em alguns unicelulares (KIESS & GALLAHER, 1998).

2.3 - Mecanismos e genes da apoptose

A apoptose ocorre através da ativação de um programa de suicídio intrínseco da célula. A “maquinaria” básica necessária para realizar a apoptose parece estar presente em todas as células de mamíferos, mas sua ativação é regulada por sinais intra e extracelulares. Embora vários sinais possam induzir a apoptose em diferentes tipos celulares, pelo menos alguns componentes do programa apoptótico foram conservados na evolução animal regulando uma via final comum de morte celular preservada, de vermes a humanos, sugerindo que este processo de morte pode ser fundamental para o controle de células e tecidos em organismos metazoários (WYLLIE, 1994; THOMPSON, 1995; STELLER, 1995).

As moléculas efetoras apoptóticas estão presentes na maioria das células dos mamíferos. A necessidade de síntese de RNA e de proteína para a indução da morte celular em certas situações pode refletir a necessidade de sintetizar moléculas que ativam ou reprimem a “maquinaria” de morte celular, ao invés de sintetizar qualquer componente necessário para morte celular em si. Se as proteínas efetoras da apoptose estão presentes em células vivas, suas atividades potencialmente letais devem ser suprimidas nas células que sobrevivem (STELLER, 1995).

A apoptose é um processo altamente regulado. Entre os sinais que regulam a apoptose, promovendo-a ou suprimindo-a, estão: informação da linhagem, dano celular por radiação ou infecção viral, fatores de sobrevivência extracelulares, interações celulares, e hormônios (citocinas, esteróides e peptídios). Os mesmos sinais podem ter efeitos diversos em diferentes tipos celulares (STELLER, 1995). As respostas apoptóticas envolvem receptores específicos e sistemas de transdução de sinais, e segundos mensageiros, incluindo Ca^{2+} , cAMP, óxido nítrico, têm sido implicados neste processo (ORRENIUS, 1995).

Na maioria dos tecidos, as células precisam continuamente de sinais de sobrevivência fornecidos por células vizinhas e pela matriz extracelular (fatores extracelulares) (THOMPSON, 1995; STELLER, 1995). Células da maioria dos

órgãos sofrem apoptose se cultivadas individualmente na ausência de fatores exógenos de sobrevivência. Assim, provavelmente a maioria das células está programada para cometer suicídio se não receber sinais de sobrevivência do meio, tanto constantemente como em intervalos regulares (THOMPSON, 1995). Este controle social da sobrevivência celular parece garantir a manutenção de um número adequado de diferentes tipos celulares em um tecido. Os fatores de sobrevivência poderiam evitar a apoptose reduzindo a quantidade ou atividade das proteínas efetoras da morte celular para níveis menos danosos ou, talvez, aumentando a atividade das proteínas anti- apoptóticas protetoras, como os membros da família Bcl-2 (STELLER, 1995).

Apesar do considerável progresso no estudo da apoptose, há muita dificuldade na identificação das moléculas responsáveis por este processo através dos métodos bioquímicos e moleculares convencionais em mamíferos. Mas, graças às evidências de que o mecanismo da apoptose é pelo menos parcialmente conservado na evolução animal, resultados obtidos de modelos experimentais em invertebrados podem ser relevantes para a compreensão do mecanismo apoptótico em vertebrados (STELLER, 1995).

No nematoda *C. elegans* foram identificadas várias mutações que afetam estágios específicos da apoptose (a decisão de morrer ou não, a morte celular, a fagocitose da célula morta pelos fagócitos, e a degradação do material fagocitado). Estas mutações definem 14 genes que atuam na morte celular programada neste organismo, mas apenas três destes genes afetam a execução da apoptose em si: ced-3, ced-4, ced-9 (ced vem de cell death defective, ou seja, morte celular defeituosa). A atividade de ced-3 e ced-4 é necessária para que a apoptose se realize. O gene ced-9, que codifica uma proteína homóloga a família Bcl-2, é necessário para proteger as células que devem sobreviver, ao passo que a expressão do Bcl-2 humano pode inibir a morte celular em nematodas, substituindo parcialmente a perda da função do ced-9. O gene ced-3 codifica uma proteína semelhante à família das cisteína proteases, que inclui a enzima conversora da interleucina 1 β (ICE), Nedd-2/Ich-1, CPP32. A super-expressão dessas proteases nas células de mamíferos causa apoptose, e o produto do gene crmA do vírus da varíola bovina, que inibe algumas proteases similares a ICE,

pode proteger as células de mamíferos contra apoptose induzida por privação de fator de crescimento. Assim, existem boas razões para acreditar que uma cisteína protease similar a ced-3/ICE inicie o estágio irreversível da apoptose tanto em nematodas como em mamíferos. Já a proteína codificada pelo gene ced-4 não tem nenhuma similaridade com outras proteínas conhecidas (STELLER, 1995; SOLARY, 1996).

Como já foi comentado a apoptose é regulada por muitos sinais diferentes e distintos, e parece que diferentes vias sinalizadoras convergem para ativar um programa apoptótico comum, de maneira que só algumas células são selecionadas para morrer. Estudos genéticos em *Drosophila melanogaster* mostra que a maioria senão todas as mortes celulares programadas são mediadas por um mecanismo comum, o gene *reaper*, que é capaz de integrar as informações de diferentes vias sinalizadoras para ativar o programa apoptótico, sendo que a expressão de *reaper* é suficiente para induzir a apoptose em células que normalmente sobreviveriam. Assim, o gene *reaper* pode ser considerado como um ativador universal da apoptose apesar de não fazer parte do programa apoptótico em si, pois a apoptose pode ser induzida em células que não o apresentam, sugerindo que o gene *reaper* codifica uma molécula reguladora e não efetora. Este gene poderia agir ativando efetores da morte celular ou inibindo seus reguladores negativos, sendo possível que a convergência dos diferentes sinais ocorra ao nível do promotor do gene *reaper* (STELLER, 1995).

Apesar de se acreditar que as células apoptóticas sofrem clivagem endonucleolítica do DNA, células sem núcleo, fisiologicamente ativas, podem ser induzidas a sofrer as mudanças citoplasmáticas características da apoptose. Em contraste, núcleos isolados podem exibir condensação e degradação oligonucleossômica do DNA em sistemas acelulares. A partir destas observações sugere-se que múltiplos fatores podem contribuir para a morte e diferentes compartimentos celulares têm considerável autonomia em sofrer mudanças estruturais durante a apoptose (STELLER, 1995).

É provável que alguns componentes do programa apoptótico sejam compartilhados com outros processos celulares, incluindo a mitose. Por exemplo, fatores de crescimento podem tanto estimular o desenvolvimento celular quanto

evitar a morte celular. Outro apoio para esta conexão vem de genes implicados na regulação da proliferação celular e no controle da apoptose, como p53, c-myc, Rb-1, ciclina D1 e outros. Alguns destes genes afetam a apoptose em situações específicas (STELLER, 1995; SOLARY, 1996). Por exemplo, o p53, gene supressor tumoral, que tem grande importância na regulação do ciclo celular, parece ser predominantemente necessário para mediar resposta apoptótica em resposta a dano ao DNA, evitando, assim, o aparecimento de neoplasias. No curso de ativação, o p53 está em uma posição anterior ao programa básico de suicídio celular (STELLER, 1995; SOLARY, 1996; HEGENBERGER & GHIRLANDA, 1997). Outros genes associados com a proliferação celular, como o c-myc são capazes de induzir apoptose quando são aberrantemente expressados (WYLLIE, 1994; STELLER, 1995; SOLARY, 1996). Mesmo assim, parece que a natureza terminal e as características específicas da apoptose requerem pelo menos alguns componentes especificamente devotados a este processo (STELLER, 1995).

2.3.1 - Fator Fas

Em 1989, dois grupos independentes isolaram anticorpos de ratos com atividade citolítica para várias células humanas. As proteínas de superfície celular reconhecidas por estes anticorpos foram designadas Fas e APO-1, respectivamente (NAGATA & GOLDSTEIN, 1995; HEGENBERGER & GHIRLANDA, 1997). Este receptor é uma proteína de membrana tipo 1 de 325 aminoácidos. O ligante deste receptor é uma proteína de membrana tipo 2 de peso molecular 40000 denominada FasL (HEGENBERGER & GHIRLANDA, 1997). O Fas, também chamado CD95 ou APO 1, é uma molécula transmembrana da família TNF (fator de necrose tumoral), que interage com FasL (CD95L) – da família TNF/FCNeural - para indução da apoptose (ROITT, 1999).

A ativação da seqüência apoptótica requer ligação cruzada do Fas com FasL solúvel, células expressando FasL ou anticorpos monoclonais para Fas (SOLARY, 1996; HEGENBERGER & GHIRLANDA, 1997). O Fas ativado interage com várias proteínas celulares e ativa uma seqüência dependente de

esfingomielinase. A apoptose mediada por Fas é ativada por proteases ICE ou similares a ICE (SOLARY, 1996). A expressão de Fas aumenta por ação do interferon gama e $TNF\alpha$ deixando a célula mais suscetível à interação com FasL e conseqüente apoptose, o que explica, em parte, por que estas citocinas aumentam a toxicidade mediada por linfócitos T (HEGENBERGER & GHIRLANDA, 1997).

O receptor de Fas está presente em vários tipos celulares somáticos, sendo abundantemente expressado em linfócitos ativados e em células primárias de vários outros tecidos, como fígado, coração, pulmões e ovários. Já o FasL é expressado predominantemente em linfócitos T CD4+ e CD8+ ativados e em células NK. O sistema Fas e FasL está envolvido na deleção clonal de células T autoreativas na periferia, mas não no timo, na limitação da resposta imune e nos mecanismos que as células T citotóxicas usam para matar as células-alvo infectadas (um caminho distinto do caminho da perforina) (NAGATA & GOLDSTEIN, 1995; SOLARY, 1996). O mal funcionamento do sistema Fas causa distúrbios linfoproliferativos e acelera doenças autoimunes, enquanto que sua exacerbação pode causar destruição do tecido (NAGATA & GOLDSTEIN, 1995).

2.3.2 - As Caspases

As caspases, um pequeno grupo de cisteína proteases celulares, são ativadas na apoptose, colocando o processo em movimento. As caspases existem como pró-enzimas inativas e podem ser ativadas por clivagem proteolítica determinando uma cascata de eventos que incapacita uma variedade de funções celulares, levando à inevitável morte (DeFRANCESCO, 1997; STITES *et al*, 1997). Alguns vírus produzem inibidores específicos das caspases, impedindo a apoptose das células infectadas. Um dos alvos das caspases são as lamininas, proteínas nucleares filamentosas que organizam a estrutura da cromatina; a clivagem das lamininas pode ser um mecanismo na iniciação da fragmentação nuclear característica da apoptose (STITES *et al*, 1997). Além da destruição do citoesqueleto do núcleo e do citoplasma pela clivagem de proteínas estruturais, levando a mudanças morfológicas gerais, acredita-se que as caspases atuem na

incapacitação de enzimas envolvidas com a função e manutenção do genoma, deixando a célula incapaz de reparar danos no DNA e reduzindo o número de transcritos produtivos; no rearranjo da membrana plasmática, levando a fosfatidilserina a se expor externamente à membrana, sinalizando a morte para células envolvidas com a remoção de detritos, como os macrófagos; na fragmentação do DNA; na liberação de células em tecidos por clivagem da cinase de adesão focal (FAK) (DeFRANCESCO, 1997).

2.3.3 - Ca⁺⁺

O aumento da concentração de Ca⁺⁺ intracelular tem se mostrado necessário para desencadeamento da apoptose em vários tipos celulares, inclusive para a morte da célula-alvo induzida por célula T citotóxica. Este aumento pode ser crítico para a ativação das endonucleases presentes no núcleo da célula e conseqüente morte celular induzida (MALE *et al*, 1991; ORRENIUS, 1995; KIESS & GALLAHER, 1998). A presença de atividade de enzimas dependentes de Ca²⁺/Mg²⁺ geradoras de clivagem cromatínica com padrão apoptótico foi encontrada em vários tipos celulares (ORRENIUS, 1995; KIESS & GALLAHER, 1998).

2.3.4 - Controle Hormonal da apoptose

Fatores de crescimento, como o fator de crescimento epidérmico e o fator de crescimento similar a insulina/ família insulina são capazes de evitar a apoptose em muitas células. Acredita-se que genes como o c-myc, que podem induzir tanto a proliferação como a morte celular, tenham um papel central na apoptose causada por retirada de fatores de crescimento. Alguns neurônios dependentes de fatores neurotróficos sofrem apoptose na ausência destes. Acredita-se que a suscetibilidade de uma célula para a indução da apoptose seja conseqüência da ativação de vias sinalizadoras estimuladoras e inibidoras do crescimento simultaneamente (KIESS & GALLAHER, 1998).

Hormônios esteróides têm um papel importante na regulação do crescimento, desenvolvimento, homeostase e morte celular programada. Juntamente com outros hormônios e fatores de crescimento, os esteróides regulam a indução e inibição da morte celular. Glicocorticóides induzem apoptose em timócitos imaturos e células T através de um processo ativo caracterizado por fragmentação do DNA. Os glicocorticóides podem regular também a apoptose no sistema nervoso central, reprimindo a morte celular no hipocampo. Esteróides sexuais têm um importante papel na regulação da apoptose no ovário: enquanto o estrogênio inibe a apoptose da granulosa ovariana, androgênios parecem elevar a fragmentação do DNA. Já a progesterona é um potente inibidor da apoptose nas células do câncer de mama (KIESS & GALLAHER, 1998).

A morte celular durante a metamorfose de anfíbios está sob controle hormonal: o hormônio da tireóide é capaz de iniciar a apoptose e levar a regressão da cauda durante o desenvolvimento dos anfíbios (KIESS & GALLAHER, 1998).

Os hormônios peptídios também participam da regulação da apoptose. Por exemplo, a prolactina e o hormônio adenocorticotrófico (ACTH) têm a capacidade de prevenir a apoptose (KIESS & GALLAHER, 1998).

As células epiteliais da próstata sofrem apoptose após castração, mostrando que os androgênios funcionam como reguladores endógenos da morte celular programada. Nos ovários, a atresia dos folículos é iniciada por apoptose das células da granulosa em resposta à privação hormonal. As células da granulosa são as principais produtoras dos hormônios esteróides sexuais femininos responsáveis pelo ciclo ovariano. A apoptose no ovário limita o número de folículos capazes de ovular e evita o desenvolvimento de um número maior de embriões que não poderiam completar a gestação. Assim, só um pequeno número de folículos escapam da apoptose. Os fatores de sobrevivência dos folículos são fatores de crescimento e estrogênio enquanto androgênios e hormônios liberadores das gonadotrofinas potencializam a apoptose dos folículos (KIESS & GALLAHER, 1998).

A regulação hormonal parece ser de grande importância para o desenvolvimento das glândulas mamárias. O crescimento da glândula mamária

normal envolve a proliferação, diferenciação, apoptose e remodelamento da membrana basal através da estimulação ovariana cíclica do ciclo menstrual, gestacional e de lactação, sendo observados padrões cíclicos de divisão e morte celular. A regulação destes processos envolve a ação de estrógeno e progesterona. A regressão da glândula mamária após a lactação é induzida pelo decréscimo dos níveis de prolactina e hormônios glicocorticóides associado com o desmame. A retirada de hormônios lactogênicos ativa o programa apoptótico caracterizado por decréscimo da expressão gênica para a proteína do leite caseína e aumento da expressão de genes associados com a apoptose (KIESS & GALLAHER, 1998).

No útero, a progesterona e o estradiol têm efeito proliferativo ou anti-apoptótico sobre o endométrio. Contudo, após longa exposição à progesterona, as células do endométrio sofrem apoptose, contribuindo para a menstruação (KIESS & GALLAHER, 1998).

2.4 - Apoptose na resposta imune

Na resposta imune, a apoptose age como um mecanismo efetor na eliminação de patógenos ao lado da neutralização feita pelas imunoglobulinas, a fagocitose e reações citotóxicas por ação de perforinas. Neste âmbito, o programa de autodestruição da célula-alvo é iniciado a partir do recebimento de sinais emitidos por algumas células citotóxicas (ROITT *et al*, 1997). Assim, as células T citotóxicas podem matar a célula alvo por dois mecanismos: (1) através da exocitose da perforina, uma proteína que perfura membrana plasmática de células-alvo com antígenos associados ao MHC de classe I; (2) por apoptose (ABBAS *et al*, 1994).

A apoptose é também o processo que dá fim à vida dos plasmócitos, os produtores das imunoglobulinas, que têm uma sobrevivência de apenas alguns dias (ROITT *et al*, 1997).

Na resposta imune humoral ocorre a produção de anticorpos em resposta a antígenos. Esses anticorpos são produzidos por células B ativadas. Os linfócitos B, cujas moléculas de imunoglobulinas da membrana são capazes de reconhecer, com maior afinidade, o antígeno exposto são selecionados positivamente. Se mutações somáticas gerarem receptores que não reconhecem mais o antígeno, essas células morrem por apoptose. Esta seleção faz parte do processo chamado maturação da afinidade (ABBAS, 1994).

Além disso, a apoptose tem um papel importante no processo de seleção dos linfócitos T no timo. Os linfócitos T que apresentam receptores de afinidade muito alta ou muito baixa pelos antígenos MHC próprios sofrem apoptose e morrem (ROITT *et al*, 1997). A ligação de TCR de afinidade muito baixa leva à seleção positiva e a ligação de alta afinidade à seleção negativa. A seleção positiva no timo é responsável pelo desenvolvimento de células T restritas ao MHC próprio, ou seja, células T que expressam só TCRs restritos ao MHC próprio. Timócitos cujos TCRs não têm afinidade por MHC próprio morrem por apoptose. Já o processo de seleção negativa no timo é importante para o desenvolvimento da auto-tolerância. Os indivíduos são tolerantes a antígenos próprios pela carência de linfócitos B e/ou T específicos para esses antígenos ou

porque tais linfócitos estão presentes, mas não podem responder a antígenos próprios. A tolerância da célula T é a principal causa da tolerância a proteínas próprias e o principal mecanismo para induzir tolerância da célula T é a deleção de células auto-reativas durante sua maturação no timo (ABBAS, 1994).

Assim, a falha na indução da apoptose pode levar à persistência de linfócitos autoreativos de muitas especificidades, estímulo de numerosos clones de células B autoreativas, produção de múltiplos anticorpos, levando ao desenvolvimento de doença autoimune sistêmica, como o lúpus eritematoso sistêmico (ABBAS *et al*, 1994).

Em alguns casos, autoanticorpos podem penetrar em células vivas do organismo, alterando sua função e causando apoptose. Isto pode ter alguma função não só na regulação imune e prevenção de doenças autoimunes, como também na patogênese destas doenças autoimunes (ALARCÓN-SEGOVIA *et al*, 1996)

2.5 - Apoptose na patogênese de doenças

A alteração da homeostase na morte celular é um evento essencial na patogênese de várias doenças (PIACENTINI, 1999). A falha na morte celular apoptótica está envolvida na patogênese de várias doenças humanas, incluindo câncer, doenças autoimunes, e infecções virais. Em contrapartida, um grande número de doenças associadas com perda celular, como doenças neurodegenerativas, AIDS, e osteoporose, podem ser consequência de altas taxas de morte celular (Tabela 1)(THOMPSON, 1995).

Tabela 1 - Doenças associadas com indução ou inibição da apoptose (THOMPSON, 1995).

Doenças associadas com inibição da apoptose	Doenças associadas com aumento da apoptose
1. Câncer Linfomas foliculares Carcinomas com mutações no p53 Tumores dependentes de hormônios Câncer de mama Câncer de próstata Câncer de ovário	1. Doenças neurodegenerativas Alzheimer Parkinson Esclerose lateral amiotrófica Retinite pigmentosa Degeneração cerebelar
2. Doenças autoimunes Lúpus eritematoso sistêmico Glomerulonefrite imune-mediada	2. Síndromes mielodisplásicas Anemia aplásica
3. Infecções virais Herpesvírus Poxvírus Adenovírus	3. Lesões isquêmicas Infarto do miocárdio Ataque cardíaco Lesão por reperfusão
	4. AIDS
	5. Hepatopatias induzida por toxina Álcool

2.5.1 - Doenças associadas com aumento da sobrevivência celular

2.5.1.1 - Apoptose e câncer

Existem duas grandes razões para o crescente interesse no papel da apoptose no câncer: 1) a relação entre a proliferação e a morte celular determinam a velocidade do crescimento de um tumor; 2) a apoptose é um mecanismo eficiente na prevenção de uma transformação maligna pois remove as células com danos genéticos. Assim, falhas da apoptose podem levar à formação de um tumor por permitir o acúmulo de células em divisão e por não remover variantes genéticas com elevado potencial maligno (ORRENIUS, 1995).

O câncer é uma doença vista normalmente como proliferação celular excessiva. Mas, falhas no processo de apoptose parecem contribuir para a patogênese desta doença (WYLLIE, 1994; THOMPSON, 1995; SOLARY *et al*, 1996). Por exemplo, as células metastáticas tumorais apresentam um certo grau de independência dos fatores de sobrevivência do meio, podendo evitar a apoptose e sobreviver em locais diferentes de seu tecido de origem (THOMPSON, 1995).

Vários oncogenes e anti-oncogenes regulam a apoptose. Oncogenes que promovem proliferação celular e aqueles que inibem a morte celular poderiam cooperar para induzir uma lesão neoplásica (SOLARY *et al*, 1996). O bcl-2, inicialmente visto como oncogene, não tem relação com a proliferação celular. Um aumento na expressão deste gene impede as células de iniciarem apoptose em resposta a vários estímulos e, inclusive, confere resistência à morte celular em resposta a agentes quimioterápicos (THOMPSON, 1995). Muitos tumores contam com uma alta taxa de expressão do bcl-2 ou produtos gênicos relacionados para impedir a morte celular, como por exemplo, linfomas, leucemias, adenocarcinomas, neuroblastomas, câncer de pulmões e rins e melanomas (SOLARY *et al*, 1996).

Um regulador do bcl-2 que se torna alterado no câncer é o supressor de tumor p53, que inibe a expressão do bcl-2. A proteína p53 se liga ao DNA e

funciona, pelo menos em parte, como um regulador da transcrição, ativando ou reprimindo a expressão de vários genes envolvidos na replicação e reparo do DNA, sendo capaz de interromper o ciclo celular na fase G1/S em resposta a danos ao DNA para facilitar o seu reparo. (SOLARY et al, 1996). Além disso, o produto do p53 é necessário para a célula iniciar a apoptose em resposta a danos genotóxicos, contribuindo para a supressão do crescimento tumoral (THOMPSON, 1995; SOLARY et al, 1996). O p53 se torna inativado em mais da metade dos tumores humanos (SOLARY et al, 1996). A incapacidade das células em sofrer apoptose em resposta ao dano ao DNA pode estar relacionada a uma maior resistência aos agentes quimioterápicos e à radiação, conforme observado em tumores deficientes em p53 (THOMPSON, 1995).

O p53 também ativa a expressão do bax, cuja proteína funciona como um promotor da morte celular. O bax e o bcl-2 fazem parte de uma família de proteínas que podem promover ou reprimir a apoptose e incluem Bcl-x, mcl-1, A1, BAK, Bad, BAG-1, dentre outros. (SOLARY, 1996).

A apoptose pode ser um mecanismo que protege o organismo de células geneticamente alteradas e mais suscetíveis à proliferação celular. Assim, a inibição da apoptose tem uma grande importância no desenvolvimento de malignidades (THOMPSON, 1995).

2.5.1.2 - Apoptose e autoimunidade

Para ser capaz de reconhecer e destruir uma grande variedade de antígenos, os vertebrados são equipados com um poderoso mecanismo genético (rearranjo do DNA) para diversificar seu repertório de receptores para antígenos. Em razão da natureza aleatória da diversificação dos receptores, esse mecanismo inevitavelmente gera células que respondem aos antígenos próprios do organismo, levando potencialmente à doença autoimune (ORRENIUS, 1995). Estes linfócitos auto-reativos normalmente sofrem apoptose no início do seu desenvolvimento (seleção negativa) (THOMPSON, 1995; ORRENIUS, 1995; SOLARY, 1996; HEGENBERGER & GHIRLANDA, 1997). Normalmente 95% dos linfócitos T que migram para o timo para “amadurecer” e se diferenciar morrem

por seleção negativa por reagirem com autoantígenos (HEGENBERGER & GHIRLANDA, 1997). Contudo, um defeito na sua deleção (apoptose) poderia levar à autoimunidade (THOMPSON, 1995; ORRENIUS, 1995; SOLARY, 1996; HEGENBERGER & GHIRLANDA, 1997; PIACENTINI, 1999). A apoptose é também essencial para remoção do excesso de células após a conclusão da resposta imune. (THOMPSON, 1995).

Alterações na suscetibilidade dos linfócitos de sofrer apoptose *in vitro* têm sido reportadas em várias doenças autoimunes, como lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide, diabetes autoimune e doença inflamatória da bexiga (THOMPSON, 1995; EMLÉN *apud* SOLARY, 1996).

As observações mais informativas até agora foram realizadas em ratos da linhagem MRL. Mutações recessivas espontâneas no seu cromossomo 19, loco *lpr* (de doença linfoproliferativa) e no cromossomo 1, loco *gld* (de doença linfoproliferativa generalizada) induzem doenças autoimunes com características semelhantes - artrite, nefrite, linfadenopatia e esplenomegalia por proliferação de linfócitos (SOLARY, 1995; HEGENBERGER & GHIRLANDA, 1997) - que se parecem com lúpus eritematoso sistêmico (ORRENIUS, 1995; THOMPSON, 1995). Estes ratos morrem aos 5 meses por processos autoimunes (SOLARY, 1995; HEGENBERGER & GHIRLANDA, 1997). A mutação *lpr* afeta uma proteína de superfície celular chamada Fas (ou APO1 ou CD95); enquanto *gld* afeta um ligante endógeno para o receptor Fas, o ligante Fas (THOMPSON, 1995; ORRENIUS, 1995; SOLARY, 1996; HEGENBERGER & GHIRLANDA, 1997; PIACENTINI, 1999). Assim, estes ratos não eliminam eficientemente os linfócitos T autoreativos (ORRENIUS, 1995; HEGENBERGER & GHIRLANDA, 1997), levando a um acúmulo de células T e linfadenopatia (ORRENIUS, 1995).

Outros genes, além do Fas e ligante Fas estão provavelmente envolvidos na patologia relacionada ao Fas, pois a mutação *lpr* induz nefrite ou artrite em ratos MRL mas não em ratos C3M (SOLARY, 1996).

Em humanos, dois estudos recentes identificaram mutações no gene Fas em crianças que desenvolveram uma doença autoimune linfoproliferativa rara, caracterizada por linfadenopatia não maligna, fenômenos autoimunes e expansão da população de linfócitos imaturos (SOLARY, 1996).

Pacientes com lúpus eritematoso sistêmico têm altos níveis de Fas solúvel, que poderia inibir competitivamente o ligante Fas – interações Fas. O decréscimo na apoptose mediada por Fas pode contribuir para o acúmulo de células autoimunes nestas doenças (THOMPSON, 1995; SOLARY, 1996).

Ratos com uma doença autoimune semelhante ao lúpus eritematoso sistêmico apresentam um aumento da expressão do bcl-2 em células B (THOMPSON, 1995; SOLARY, 1996), o que parece ocorrer também em pacientes com esta doença (ORRENIUS, 1995). O bcl-2 está associado também com diabetes autoimune em ratos (THOMPSON, 1995; SOLARY, 1996).

Em relação as diabetes mellitus do tipo 1, uma doença autoimune associada com a destruição das células beta pancreáticas, o soro dos pacientes contém um fator que promove apoptose mediada por Ca^{++} em células produtoras de insulina (ORRENIUS, 1995; SOLARY, 1996).

2.5.1.3 - Apoptose e infecções virais

As células infectadas por vírus podem sofrer apoptose como um mecanismo de defesa para evitar a propagação viral. As células T citotóxicas também atuam no sentido de evitar a propagação viral, reconhecendo e matando as células que apresentam peptídeos virais em associação com MHC de classe I. As células T citotóxicas induzem a apoptose tanto por ativação do receptor Fas na superfície da célula-alvo ou usando a perforina para introduzir proteases na célula-alvo (THOMPSON, 1995; SOLARY, 1996; HEGENBERGER & GHIRLANDA, 1997).

Para burlar estas defesas, alguns vírus desenvolveram mecanismos que rompem a regulação normal da apoptose na célula infectada. Para isto, os genes virais codificam proteínas inibitórias que interferem com as vias que levam a apoptose (THOMPSON, 1995; SOLARY, 1996; HEGENBERGER & GHIRLANDA, 1997).

O gene crm A do vírus da varíola bovina codifica um inibidor de proteases que evita a apoptose através da inibição da ICE. Outros genes virais, como por exemplo, o gene BHRF 1 do vírus Epstein-Barr, gene LMW5-HL do vírus da peste suína africana, e o gene E1B do adenovírus, codificam proteínas estrutural e

funcionalmente similares ao Bcl-2 (THOMPSON, 1995; SOLARY, 1996). O produto de alguns genes virais, como LMP-1 do vírus Epstein-Barr, pode elevar a expressão do Bcl-2 para permitir o estabelecimento da latência viral (SOLARY, 1996).

Os genes p35 e IAP (proteína inibidora da apoptose), encontrados em baculovírus, podem inibir a apoptose em resposta a vários estímulos. A habilidade do p35 em inibir a apoptose independe da expressão de qualquer outra proteína viral (THOMPSON, 1995; SOLARY, 1996).

2.5.2 - Doenças associadas com excesso de apoptose

2.5.2.1 - Apoptose e AIDS

O sinal distintivo da AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida) é o declínio no número das células T CD4 do paciente. As células T CD4 são responsáveis, direta ou indiretamente, por todas as respostas imunes. Quando a contagem de linfócitos T cai abaixo de um determinado limite, o paciente não é mais capaz de dispor de respostas imunes e começa a sofrer uma série de perigosas infecções.

O vírus HIV (vírus da imunodeficiência humana) pode causar a depleção de células T CD4 + por estimular sinais que induzem a apoptose. Tem sido postulado também que a apoptose induzida por HIV causa a perda de células T em desenvolvimento no timo (ABBAS *et al*, 1994).

A maioria das células T que morre durante a infecção por HIV parece não estar infectada pelo HIV. Algumas evidências sugerem que o produto viral solúvel – gp120 – promove apoptose das células T não infectadas através de sua ligação com o receptor CD4 (THOMPSON, 1995; ORRENIUS, 1995; SOLARY *et al*, 1996; HEGENBERGER & GHIRLANDA, 1997).

A ligação de receptores CD4 pela proteína gp120 do HIV ou por imunocomplexos gp120/anti-gp120 prepara a célula T CD4 para a apoptose em resposta ao estímulo subsequente do receptor da célula T, como a ligação de um complexo antígeno-MHC de classe II. Se uma célula preparada pelo primeiro sinal for ativada por um antígeno, pode ocorrer a apoptose da célula sem infecção por HIV (ORRENIUS, 1995).

Parece estranho que um vírus desenvolva um mecanismo para exaurir suas células hospedeiras; mas, isso pode estar ligado ao fato que a célula T CD4 proporciona proteção contra infecção viral. Assim, o estabelecimento de uma infecção HIV crônica pode depender da depleção das células T CD4+ mediada por vírus e concomitante perda da resposta imune celular (THOMPSON, 1995).

Recentemente, foi demonstrado que a proteína Tat do HIV-1 induz a apoptose em uma linhagem de células T e em células mononucleares periféricas

do sangue de doadores não infectados. Esta proteína induz a ativação prematura de cinases ciclina-dependentes, um evento associado com a indução da apoptose em outros sistemas celulares. As células T ativadas por Tat seriam deletadas quando o receptor da célula T fosse ativado por um antígeno ou a proteína gp120 se ligasse ao receptor CD4 (SOLARY *et al*, 1996).

O Fas pode estar envolvido na morte celular das células T CD4 durante a infecção por HIV, pois as células infectadas apresentam um aumento na expressão do Fas (SOLARY *et al*, 1996; HEGENBERGER & GHIRLANDA, 1997).

A hipótese atual é que a Tat e a gp120 aceleram a apoptose induzida por ativação e mediada por Fas na célula T (SOLARY *et al*, 1996).

Embora a gp120 tenha um importante papel em preparar as células T CD4 para a apoptose, outros mecanismos, como aumento da produção de citocinas, dentre eles o fator de necrose tumoral α (TNF α) e alterações metabólicas associadas, podem contribuir para a indução da morte celular na infecção por HIV (ORRENIUS, 1995).

A replicação viral não fica prejudicada por esta forma de morte celular pois a proteína viral Nef regula negativamente o receptor CD4 em células infectadas, o que pode impedir a reinfeção viral e apoptose mediada por CD4 (THOMPSON, 1995; SOLARY *et al*, 1996).

Alguns resultados experimentais sugerem que os linfócitos T de indivíduos infectados por HIV produzem menor quantidade das interleucinas de tipo I (IL-1 e 2) e maior quantidade das citocinas de tipo II (incluindo a IL 10). As citocinas de tipo I reduzem a morte celular apoptótica de linfócitos infectados por HIV *in vitro*. Já as citocinas de tipo 2 não tem efeito ou aumentam a apoptose (CLERICI & SHEARER, 1997).

Um dos problemas associados à infecção por HIV em indivíduos com idade mais avançada, e que torna seu tratamento mais complicado, é o controle dos eventos apoptóticos. Em pacientes infectados pelo HIV, com idade superior a 50 anos, o processo de reposição das células T destruídas pela infecção é menos eficiente, contribuindo para uma evolução mais acelerada da doença (ADLER e NAGEL, 1999).

2.5.2.2 - Apoptose e doenças neurodegenerativas

As doenças neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica (ELA), retinite pigmentosa e degenerações cerebelares, se caracterizam por perda gradual de conjuntos específicos de neurônios. A perda celular nestas doenças não está associada à resposta inflamatória, sendo provável que a apoptose seja o principal mecanismo de morte celular, tendo como indutores principalmente o stress oxidativo, aumento de cálcio intracelular, defeitos mitocondriais, toxicidade por aminoácidos excitatórios ou deficiências de fatores de crescimento (THOMPSON, 1995; HEGENBERGER & GHIRLANDA, 1997). O limiar apoptótico de uma célula é dinamicamente regulado, ou seja, é determinado por efeitos combinados de fatores de sobrevivência externos e internos. Vários fatores de crescimento específicos e menos específicos, a matriz extracelular e a elevada expressão do gene bcl-2 impedem a apoptose das células neurais (THOMPSON, 1995; ORRENIUS, 1995; SOLARY, 1996). Por exemplo, o aumento na expressão do Bcl-2 diminui a neurotoxicidade dos indutores potenciais da morte celular. Fatores de crescimento neurotróficos e a matriz extracelular também alteram o limiar apoptótico das células neuronais (THOMPSON, 1995).

Várias mutações gênicas que levam a um aumento da morte apoptótica da célula foram identificados em doenças neurodegenerativas (SOLARY, 1996). Uma forma hereditária de esclerose lateral amiotrófica resulta de mutações no gene que codifica a enzima superóxido dismutase. Essas mutações diminuem a habilidade dos neurônios motores de detoxificar radicais livres, levando à indução da apoptose em decorrência de injúrias sofridas por estas células (THOMPSON, 1995; SOLARY, 1996; HEGENBERGER & GHIRLANDA, 1997). Esta morte pode ser especificamente inibida por tratamento com fatores de crescimento, sobrevivência ou antioxidantes (THOMPSON, 1995). O aumento da concentração de glutamato no meio extracelular também pode provocar a apoptose neuronal (ORRENIUS, 1995; HEGENBERGER & GHIRLANDA, 1997), participando da patogênese da ELA (HEGENBERGER & GHIRLANDA, 1997).

A degeneração da retina na retinite pigmentosa ocorre como resultado de mutação em qualquer dos três genes fotorreceptores específicos. Todas as mutações levam à apoptose do fotorreceptor, que pode ser iniciada em resposta ao acúmulo de proteínas mutantes ou como resultado de propriedades funcionais alteradas de proteínas mutantes (THOMPSON, 1995; SOLARY, 1996). O tratamento destas doenças pode ser possível com fatores neurotróficos específicos, isolados ou em associação (THOMPSON, 1995).

No mal de Alzheimer, o acúmulo progressivo do peptídeo β amilóide causa a perda neuronal por apoptose ao interferir no metabolismo normal da célula ou por impedir a ação de fatores de crescimento liberados pelas sinapses das células gliais adjacentes (THOMPSON, 1995; HEGENBERGER & GHIRLANDA, 1997). Este efeito pode ser revertido por antioxidantes (THOMPSON, 1995).

Nas atrofas musculares espinhais foram identificadas mutações no gene da proteína inibitória da apoptose neuronal (NAIP) - um gene homólogo ao IAP (do baculovírus). Mutações neste gene podem resultar em neurônios mais suscetíveis à apoptose (THOMPSON, 1995; SOLARY, 1996).

Variantes anormais de uma proteína prion, normalmente sintetizadas nos neurônios, são responsáveis por várias enfermidades. Sua neurotoxicidade é mediada por apoptose (ORRENIUS, 1995; HEGENBERGER & GHIRLANDA, 1997).

5.2.2.3 - Apoptose e doenças hematológicas

A hematopoese é regulada por fatores de crescimento hematopoéticos como fator da célula tronco, fatores estimulantes de colônia, eritropoetina e trombopoetina. Estes fatores agem, em parte, promovendo a sobrevivência das células progenitoras por reprimir a apoptose durante a sua diferenciação. Um grande número de doenças hematológicas como síndromes mielodisplásicas, anemia aplásica, neutropenia crônica ou β talassemia severa estão associadas com aumento da apoptose na medula óssea, que poderia resultar de ativação de genes que promovem apoptose, de deficiências adquiridas nas células do estroma ou nos fatores de sobrevivência hematopoéticos ou, ainda, dos efeitos

diretos de toxinas e mediadores da resposta imune (THOMPSON, 1995; SOLARY, 1996).

2.5.2.4 - Apoptose e o sistema cardiovascular

O infarto do miocárdio e o ataque cardíaco resultam da perda aguda do fluxo sanguíneo (isquemia). As células na área isquêmica parecem morrer rapidamente por necrose. Mas, fora da área central de isquemia, as células parecem morrer por apoptose. A rápida reperfusão de vasos sanguíneos agudamente ocluídos induz um aumento na produção de radicais livres e na concentração de cálcio intracelular, com consequente apoptose dos miócitos cardíacos (THOMPSON, 1995; SOLARY, 1996).

A apoptose está envolvida também na patogênese de arritmias, displasia muscular de pequenos vasos coronários, miocardiopatias e displasia arritmogênica do ventrículo direito (HEGENBENDER & GHIRLANDA, 1997).

2.5.2.5 - Outras doenças

Doenças degenerativas do sistema muscular e esquelético, incluindo artrite e osteoporose, também podem ser consequência do aumento da apoptose de condrócitos e osteócitos, respectivamente (THOMPSON, 1995; SOLARY, 1996). A apoptose é uma característica patológica no rim policístico e hepatopatias induzidas por toxinas (incluindo álcool) (THOMPSON, 1995; SOLARY, 1996).

No estômago, estudos sugerem que a apoptose intervém na renovação da mucosa gástrica. Em pacientes com úlcera duodenal, infectados com *Helicobacter pylori*, foram encontradas numerosas células apoptóticas. A bactéria pode atuar induzindo apoptose, favorecendo o aparecimento da doença. A erradicação da *Helicobacter pylori* levaria a uma desinflamação da mucosa e diminuição da apoptose a níveis normais. Outros estudos revelam que o álcool e os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) se comportam como indutores da apoptose neste órgão. As células displásicas e cancerosas gástricas também mostram um aumento da expressão de bcl-2 (HEGENBERGER & GHIRLANDA, 1997).

2.6 - Apoptose e senescência

O controle da homeostase nos tecidos é alterado durante o envelhecimento, ocorrendo um aumento da taxa de morte celular. A natureza desta perda celular relacionada à idade pode ser apoptótica (SOLARY, 1996; PHELOUZAT *et al*, 1999), como consequência de diminuição da síntese de vários fatores de crescimento, inabilidade de enfrentar o stress oxidativo, ou anormalidades na regulação do ciclo celular (SOLARY, 1996). A quantificação de fragmentos de DNA associados a histonas mostra que o processo de apoptose é grandemente amplificado em linfócitos ativados derivados de organismos senescentes. Defeitos na sinalização transmembrana estão envolvidos neste processo (PHELOUZAT *et al*, 1999). Mas, a senescência também pode estar relacionada com a falha da apoptose: a apoptose mediada por fas é reduzida em células T de ratos adultos quando comparada com ratos jovens (SOLARY, 1996)

Estudos de vários parâmetros imunológicos e endocrinológicos em pessoas centenárias saudáveis indicam que seu sistema imune tem características peculiares que podem ajudar a explicar sua bem sucedida longevidade. Suas células mononucleares sangüíneas periféricas parecem ser menos suscetíveis à apoptose induzida por vários agentes (ORRENIUS, 1995).

2.7 - Métodos de avaliação da apoptose

As células apoptóticas sofrem modificações do volume celular, da densidade citoplasmática e da organização nuclear. A redução volumétrica pode ser simultânea à condensação citoplasmática e à clivagem cromatínica induzidas pelas enzimas nucleolíticas (CAFFORIO, 1996).

Nos últimos anos foram testados inúmeros métodos com o propósito de permitir a avaliação quantitativa e qualitativa da apoptose. As modificações celulares mais facilmente analisáveis no curso do fenômeno são as alterações citomorfológicas e as variações do conteúdo de DNA. As metodologias mais comumente utilizadas para o estudo em detalhe dos eventos associados à apoptose são microscopia eletrônica, técnicas eletroforéticas e citofluorimetria, capazes de evidenciar a característica degradação do conteúdo nuclear (CAFFORIO, 1996).

As alterações morfológicas da célula podem ser evidenciadas através da microscopia eletrônica, enquanto a análise planimétrica da imagem permite, através das diferenças cromáticas, revelar mudanças estruturais mínimas em relação a densidade nuclear. Assim, a microscopia eletrônica permite reconhecer as fases do fenômeno, com a vantagem de apresentar com alta resolução as modificações morfológicas da célula apoptótica. Mas tal metodologia tem fins analíticos e requer a disponibilidade de um equipamento de alto custo. Avaliações analíticas detalhadas podem ser obtidas com a microscopia a laser confocal, onde a condensação da cromatina e a fragmentação do núcleo são observadas no exame de seções óticas em série das células ou núcleos corados (CAFFORIO, 1996).

Outro método de investigação quantitativa e qualitativa da apoptose é a citofluorimetria a fluxo, onde são ressaltados a variação das dimensões celulares e o aumento da densidade citoplasmática através de padrões de dispersão da luz, permitindo reconhecer eletivamente as células apoptóticas. Esta técnica pode ser usada também para o estudo do DNA apoptótico podendo-se utilizar diferentes fluorocromos que se ligam especificamente à dupla hélice do DNA, como a mitramicina, o laranja de acridina e os derivados fenantridínicos, como o propídio

de iodo e o brometo de etídio, que são pouco fluorescentes na forma livre ao passo que a ligação com a dupla hélice exalta sua capacidade de emissão de fluorescência (CAFFORIO, 1996).

Outra metodologia citofluorimétrica indicada para análises quantitativas e qualitativas das células apoptóticas prevê o uso da anexinaV conjugada com o FITC (isotiocianato de fluoresceína), um complexo que se liga à membrana celular, favorecendo a exposição da fosfatidilserina, associada às fases iniciais do processo apoptótico (CAFFORIO, 1996).

As metodologias citofluorimétricas associam relativa simplicidade e versatilidade no estudo qualitativo e quantitativo da apoptose. Em particular, o propídio de iodo permite examinar as células diretamente na solução corante e discriminar as células apoptóticas e não apoptóticas. O único limite desta técnica é o fato de os citofluorômetros poderem ser utilizados unicamente para o estudo de suspensões celulares em fase líquida (CAFFORIO, 1996).

A coloração do DNA com fluorocromos ligantes à dupla hélice é a metodologia mais difundida para evidenciar os diferentes estados do ciclo celular e para análises diferenciadas com células vivas, embora seja necessária uma notável experiência para discriminar células necróticas e apoptóticas (CAFFORIO, 1996).

A eletroforese do DNA em gel de agarose é usada rotineiramente para visualização do ácido nucléico fragmentado. A cromatina degradada em oligossomos das células apoptóticas apresenta um padrão de banda característico, que pode ser confirmado pela coloração com o fluorocromo brometo de etídio. Mas, a eletroforese apresenta como desvantagens a necessidade de um grande número de células para a extração do DNA e o emprego de material tóxico (o brometo de etídio é mutagênico) ou radioativo, além de não possibilitar análises quantitativas (CAFFORIO, 1996).

Uma variante da eletroforese é o Southern Blott, no qual se verifica a fragmentação através de sondas de DNA radiomarcadas. Embora esta técnica permita uma maior resolução dos oligonucleossomos, a coloração com brometo de etídio tem a vantagem de maior simplicidade e rapidez do resultado evitando o uso de substâncias radioativas (CAFFORIO, 1996).

Há outra técnica denominada TUNEL que evidencia a fragmentação do DNA utilizando as extremidades 3'-OH recém formadas pela ação endonucleásica, onde se ligam os nucleotídeos (dUTP) associados a reveladores enzimáticos ou fluorocromos. Este sistema de revelação é particularmente utilizado para análises do DNA em preparações histológicas (CAFFORIO, 1996).

Uma comparação das principais técnicas de avaliação da apoptose se encontra na Tabela 2.

Tabela 2 - Vantagens e desvantagens dos métodos mais comuns de avaliação da apoptose (CAFFORIO, 1996)

	Vantagens	Desvantagens
Microscopia eletrônica e a laser confocal	Alta resolução das modificações morfológicas	Equipamento caro Não pode ser utilizada para fins quantitativos
Eletroforese do DNA em gel de agarose	Simplicidade da metodologia Elevada sensibilidade	Utilização de substâncias tóxicas ou radioativas Necessidade de um elevado número de células
Citofluorimetria	Possibilidade de análises qualitativas e quantitativas Permite o uso de diferentes fluorocromos	É aplicável a suspensões celulares em fase fluida
Tunel	Capta a apoptose em tecido fixado	Metodologia complexa

2.8 - Perspectivas para o futuro

Não há dúvida de que a apoptose tem um importante papel na patogênese e tratamento de doenças. Apesar de não poder explicar todos os fenômenos de morte celular nas várias doenças, a compreensão do papel da apoptose como um mecanismo ativo e geneticamente programado e de que muitas doenças estão relacionadas com a desregulação da morte celular trouxe otimismo para um controle da apoptose através do desenvolvimento de drogas que agem contra os componentes moleculares da "maquinaria" de morte, criando assim novas estratégias terapêuticas (STELLER, 1995, SOLARY, 1996)

As drogas quimioterapêuticas e a radiação têm sido usadas há algum tempo para o tratamento de tumores, mas só recentemente se descobriu que seu efeito é induzir a apoptose das células tumorais (THOMPSON, 1995; SOLARY, 1996). Além disso, normalmente as células tumorais sofrem o mesmo tipo de controle fisiológico para a morte celular que as células das quais elas se originam. Por exemplo, tumores provenientes de órgãos reprodutores são sensíveis à manipulação hormonal que resulta em apoptose (THOMPSON, 1995).

A estrutura da cromatina tem um importante papel na fragmentação do DNA que ocorre durante a apoptose. Esta fragmentação só ocorre quando há uma descondensação ou redução na interação histona-DNA. Substâncias que reduzem a acessibilidade da cromatina podem evitar a fragmentação do DNA, como é o caso da espermina. Já o zinco, além de estabilizar a associação proteína-DNA agindo na estrutura da cromatina, pode evitar a fragmentação do DNA associada com apoptose presumivelmente por inibir as endonucleases, mas podendo ter outros efeitos celulares já que é cofator de várias enzimas. Porém, as estratégias terapêuticas que evitam as mudanças nucleares não inibem todo o processo e a fragmentação do DNA provavelmente ocorre muito tarde para ser um bom alvo da terapia (SOLARY, 1996).

Um melhor alvo para a intervenção terapêutica são os produtos dos genes da família bcl-2 e cisteína proteases relacionadas a ICE, que estão envolvidos no controle central da apoptose e provavelmente se localizam no citosol (THOMPSON, 1995; SOLARY, 1996). Esta via é regulada por um equilíbrio entre

atividades opostas de proteínas que promovem e as que inibem a morte celular (SOLARY, 1996). Mas, por exemplo, no caso de uma doença neurodegenerativa, não seria uma vantagem aumentar a sobrevivência de todas as células neurais às custas de um aumento das doenças autoimunes ou câncer (THOMPSON, 1995).

De qualquer maneira, a super-expressão do bcl-2 relacionada à resistência às drogas citotóxicas anticâncer sugere que a inibição de sua expressão poderia aumentar a sensibilidade dos tumores à quimioterapia. Oligonucleotídeos antisense tem sido testados com sucesso para diminuir a expressão do bcl-2 *in vitro*, aumentando a sensibilidade de células neoplásicas a agentes citotóxicos. Além disso, as propriedades inibitórias do bcl-2 poderiam ser usadas para proteger as células normais da apoptose induzida pela quimioterapia. Contudo, o uso de oligonucleotídeos é problemático por várias razões. Uma melhor estratégia seria interferir nos mecanismos bioquímicos, mas estes ainda não foram totalmente elucidados (SOLARY, 1996). Além disso, a função do bcl-2 não é absolutamente necessária em todos os tipos celulares, mostrando que a inibição do bcl-2 pode não ser tão tóxica como se esperava (THOMPSON, 1995; SOLARY, 1996). Fatores de crescimento modulam a expressão e a atividade do bcl-2. Assim, agentes farmacológicos que imitam ou evitam interações específicas entre proteínas e família bcl-2 podem ser necessários para a modulação da atividade do bcl-2 (SOLARY, 1996).

Em relação à família ICE, existem inibidores específicos na natureza, como, por exemplo, o produto do gene crmA do vírus da varíola bovina. Além disso, vários vírus produzem proteínas que imitam o bcl-2 ou estimulam a expressão de bcl-2. Assim, vírus atenuados poderiam ser usados para vacinação. Ainda, há a possibilidade de se desenvolver inibidores de cisteína proteases específicos para membros individuais da família ICE (THOMPSON, 1995; SOLARY, 1996).

Além destas, podem ser desenvolvidas estratégias terapêuticas que tenham como alvo vias mais específicas do programa apoptótico, como o sistema Fas, p53, interação de citocinas e fatores de crescimento com seus receptores de membrana, dentre outros. Por exemplo, tratamentos com antioxidantes, como a n-

acetilcisteína evitam a apoptose especificamente relacionada à infecção por HIV nas células T CD4+ (THOMPSON, 1995; SOLARY, 1996).

3 - CONCLUSÃO

Finalmente, não há dúvida sobre a importância da apoptose no desenvolvimento e manutenção da homeostase dos organismos multicelulares. Assim, sua desregulação é um importante fator na patogênese de doenças, como as citadas neste trabalho. Em virtude destas recentes descobertas, abre-se um grande campo para futuras pesquisas que esclareçam melhor o papel da apoptose no controle das funções vitais e na patogênese de muitas doenças, possibilitando o surgimento de novas estratégias terapêuticas para patologias importantes como as doenças autoimunes, o câncer, a AIDS.

4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Celular and Molecular Immunology** 2ª edição. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1994.

ADLER, W. H.; NAGEL, J. E. **Immunology, aging, HIV/AIDS**. Via Internet: <http://www.iasia.org/m-14.html> Fevereiro de 1999

ALARCÓN-SEGOVIA, D.; RUIZ-ARGÜELLES, A.; LLORENTE, L. Broken dogma: penetration of autoantibodies into living cells. **Immunology Today**, v. 17, n. 4, p.163-164, 1996.

CAFFORIO, P.; ROMITO, A.; GRIZZUTI, M. A.; SILVESTRIS, F. Metodiche di valutazione della morte cellulare programmata. **Recenti Progressi in Medicina**, v. 87, n. 7-8, p. 366- 373, 1996

CLERICI, M.; SHEARER, G. M. Apoptotic T Cell death in HIV/AIDS. **Cell Death and Differentiation**, 4, p. 834, 1997

DeFRANCESCO, L. **The Death of a Cell** Via Internet: http://www.the-scientist.library.upenn.edu/yr1997/dec/profile2_971208.html Setembro de 1998

HEGENBERGER, C. M.; GHIRLANDA, M. R. Apoptosis: Revision de La Muerte Celular Programada y sus Implicancias Clinicas. **Prensa Medica Argentina**, 84, p. 381- 388, 1997

KIESS, W.; GALLAHER, B. Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. **European Journal of Endocrinology**, 138, p. 482-491, 1998

- KUBY, J. **Immunology**. 3ª edição. New York: W. H. Freeman and Company, 1997, 664pp.
- MALE, D.; CHAMPION, B; COOKE, A.; OWEN, M. **Advanced Immunology** 2ª edição. London: Gower Medical Publishing, 1991
- MAY, P. Apoptose: Perspectives et promesses. **Médecine/Sciences**, v. 14, n. 1, p. 6-8, janeiro de 1998
- NAGATA, S.; GOLDSTEIN, P. The Fas Death Factor. **Science**, 1995, vol. 267: 1449-1456.
- ORRENIUS, S. Apoptosis: molecular mechanisms and implications for human disease. **Journal of Internal Medicine**, 1995: 237: 529- 536
- PHELOUZAT, M. A.; ARBOGAST, A.; QUADRI, R. A.; LAFORGE, T.; PROUST, J. J. **Excessive apoptosis is a characteristic feature of human immune senescence**. Via internet: <http://www.iasia.org/s-28.html> fevereiro de 1999
- PIACENTINI, M. Apoptosis and autoimmunity: two sides of the coin. **Cell Death and Differentiation**, v. 6, n. 1, p. 1-2, 1999
- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 4ª edição. Editora Manole Ltda., 1997
- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 5ª edição. São Paulo: Editora Manole Ltda., 1999, 423 pp.
- SOLARY, E.; DUBREZ, L.; EYMIN, E. The role of apoptosis in the pathogenesis and treatment of diseases. **European Respiratory Journal**, 9, p.1293-1305, 1996

STELLER, H. Mechanisms and Genes of Cellular Suicide. **Science**, v. 267, p. 1445- 1449, março de 1995.

STITES, D. P.; TERR, A. I.; PARLOW, T. G. **Medical Immunology**. 9ª edição. Stamford: Ed. Appleton & Lange, 1997. 900 pp.

THOMPSON, C. B. Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of Disease. **Science**, v.267, p. 1456- 1462, março de 1995,

WYLLIE, A. H. Death from inside out: an overview. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B - Biological Sciences**, v. 345 (1313), p. 237-241, 1994